

ADSORBENT FOR IMMUNO-AFFINITY CHROMATOGRAPHY AND MANUFACTURE OF SAME

Publication number: JP58053757

Publication date: 1983-03-30

Inventor: MIHARA TOSHIO; SUZUKI HIROYASU; ISHIMATSU YOSHIKI

Applicant: DENKI KAGAKU KOGYO KK

Classification:

- international: B01J20/281; A61M1/36; B01J20/32; C07K1/16; C07K1/22; C07K14/76; C07K16/00; G01N30/88; G01N33/548; B01J20/281; A61M1/36; B01J20/30; C07K1/00; C07K14/435; C07K16/00; G01N30/00; G01N33/544; (IPC1-7): A61K39/04; B01D15/08; B01J20/26; G01N31/08; G01N33/54

- european: B01J20/32

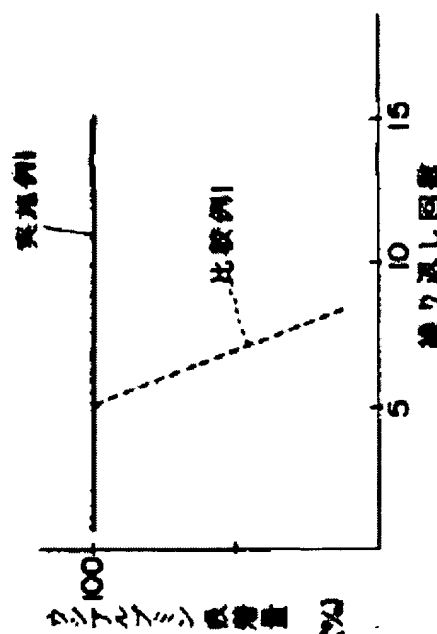
Application number: JP19810151462 19810925

Priority number(s): JP19810151462 19810925

Report a data error here

Abstract of JP58053757

PURPOSE: To obtain an adsorbent for an affinity chromatography with a strength enough to withstand repeated use thereof, by immobilizing an antibody used as ligand on a carrier with a high yield without lowering the activity thereof. **CONSTITUTION:** An antibody as ligand is oxidized by periodic acid or a salt thereof to cleave a glycol unit in the sugar chain moiety to form an aldehyde group. Then, the antibody is bonded to an immobilizing carrier having an amino group or a hydrazide group via a Schiff's base formation reaction and the Schiff's base is reduced by a reducing agent such as sodium borohydride to stabilize it. The oxidation by periodic acid occurs between adjacent hydroxyl groups of a glycol, a reaction under which 1mol of IO_4^- is reduced to IO_3^- while 2mol of aldehyde groups are generated. Structurally, the product is obtained by cleavage of a glycol unit followed by oxidation of the resulting adjacent hydroxyl groups. A relationship between the adsorption level of this adsorbent and the repeated use thereof is as illustrated, indicating no lowering of the adsorption capacity.



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58—53757

⑤ Int. Cl.³
G 01 N 31/08
A 61 K 39/04
B 01 D 15/08
B 01 J 20/26
G 01 N 33/54

識別記号
1 3 3

庁内整理番号
6514—2G
6408—4C
7203—4G
7906—2G

⑬ 公開 昭和58年(1983)3月30日

発明の数 2
審査請求 未請求

(全 10 頁)

⑭ 免疫アフィニティクロマトグラフィー用吸着体及びその製法

⑯ 特 願 昭56—151462
⑰ 出 願 昭56(1981)9月25日
⑱ 発 明 者 三原敏夫
大和市上和田910

⑲ 発 明 者 鈴木弘康
東京都文京区千駄木3—26—11
⑳ 発 明 者 石松義章
座間市入谷4—6—1
㉑ 出 願 人 電気化学工業株式会社
東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

明 細 書

1. 発明の名称

免疫アフィニティクロマトグラフィー用吸着体及びその製法

2. 特許請求の範囲

- (1) 炭水化物部位のグリコール部が酸化分断されてなるCHO基を有する抗体と側鎖にアミノ基又はヒドラジド基を有する担体とが $-CH_2-NH-$ 構造又は $-CH_2-NH-NH-CO-$ 構造を介して結合していると共に、カラムに充填し10回以上の吸脱着を繰返しても80%以上の抗原回収率を有する免疫アフィニティクロマトグラフィー用吸着体。
- (2) PH1～5の範囲で抗体に酸化剤を作用せしめ、抗体の糖鎖部位のグリコール部をアルデヒド基に酸化した後、アミノ基又はヒドラジド基を有する担体と結合させ、上記結合部分を還元してカラム使用により10回以上の吸脱着を繰返しても80%以上の抗原回収率を有する免疫

アフィニティクロマトグラフィー用吸着体の製法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は繰返し使用しうる耐久性を有する免疫アフィニティクロマトグラフィー用吸着体及びその製法に関し、より詳しくはリガンドとして抗体を使用し、その活性を低下させることなく高収率に担体に固定した免疫アフィニティクロマトグラフィー用吸着体及びその製法に関する。

酵素基質反応、抗原抗体反応等の生物学的特異性を利用したアフィニティクロマトグラフィーは特定の蛋白質を分離精製する方法として優れたものであるが、これらについては千畑他著講談社発行「アフィニティクロマトグラフィー」、山崎他著講談社発行、「アフィニティクロマトグラフィー」及び「Methods in Enzymology」34, 1974, Academic Press などに詳細に記載されている。

また、免疫アフィニティクロマトグラフィーは、特異的反応として抗原抗体反応を利用するので、生体中に含まれる微量有効成分を高純度で分離精製定量することあるいは迅速かつ定量的な

各種分析や臨床診断システム等に利用が可能であり例えば佐々木「化学と生物」誌 14(10)第658頁にも記載されているように有用なものである。

アフィニティクロマトグラフィーにおいて、リガンドの固定化方法は担体結合法、架橋法、包括法に大別され、実用的、特に工業的規模の使用においては担体結合法に属する共有結合法が最も優れたものであるといえる。

共有結合法の具体例としては、寒天中に含まれる多糖類であるアガロースを担体としこれに臭化シアンを用いて活性化させ、さらにこれをリガンドのアミノ基と結合させる方法(千畑ら「アフィニティクロマトグラフィー」講談社)、アガロースの誘導体である α -アミノアルキルアミン-アガロースのアミノ基とリガンドのカルボキシル基をカルボジイミド試薬によりペプチド結合させる方法などが知られている。(千畑ら「アフィニティクロマトグラフィー」講談社)

しかしこれらの方法においても、生物学的に活性なタンパク質例えば抗体・酵素・ホルモン等の

結合にはポリペプチド中のアミノ基、カルボキシル基等の活性官能基を利用しており、固定化されたタンパク質の生物学的な活性発現の低下等の悪影響があり、実用的ではない。

またKöhler及びMilsteinは免疫学領域に導入されたリンパ球の細胞融合法によると、特異性を有する単クローン性抗体を純度よく、しかも大量に採取することが可能になったと報告している。(Nature, 256, 495, 1975)従来の抗体は免疫動物の血清あるいは腹水から得られたものをそのまま用いるか又は冷エタノール法等で精製して用いるもので特異性の異なる抗体の混合物であり、抗原特異性、抗体力価等一定品質の抗体の生産は困難であった。しかし上記細胞融合法により、単クローン性抗体は、現在様々な抗原決定基例えば多糖類、脂質、酵素、細胞表面抗原、ウイルス、ハプテン等に対して作られており、市販もされており、入手あるいはその作製が容易である。

単クローン性抗体は従来の抗血清から得られる抗体よりも特異性の高いものが得られ、抗原の精

製、イムノアッセイ等への利用が考えられるが、従来の抗体結合法により免疫的アフィニティクロマトグラフィー用吸着体の調製を行ったのでは、高価なものとなり、また高特異的な抗体が処理工程で損失するという欠点があった。

生物学的に活性なタンパク質は糖タンパク質であることが多いが、一般に糖鎖部分は直接生物学的な活性に関係しないとされ、特に抗体は糖タンパク質であり、糖鎖の結合位置も解明されている。例えばヒトの主要抗体であるIgGは、糖鎖が定常部(constant region)のC_H2ドメインに位置し、抗原認識又は補体結合に直接関与しないことが知られている。そこで、抗体中の糖鎖を化学的に修飾し、結合する方法として、特開昭52-104591が開示されている。

本発明者らはこれら糖鎖部位を修飾した抗体を担体に結合してなる吸着体をアフィニティクロマトグラフィーに応用することを試みたが、特開昭52-104591号に示される方法では糖鎖を化学的に修飾する際に修飾された部位とポリペプチド

部位の活性基とが同時に反応し、自己会合などにより、抗体活性が阻害され、或いは抗体の固定化収率が著しく低下するなどの欠点があった。免疫アフィニティクロマトグラフィーにおいては高価な単クローン性抗体を固定するにあたり、その固定化効率の向上及び抗体活性の維持については抗原回収率の向上は工業的応用の成否を決定する重要な条件である。更にアフィニティクロマトグラフィーにおいてはカラムに充填しての繰返し使用を条件とするため、繰返し吸脱着に耐える強度と適度の粒径を必須とする。

本発明者らは上記諸条件を満足すべく研究を重ね、固定化効率の向上、抗体活性の低下防止を図るべく、糖鎖を化学的に修飾する際の条件及び繰返し使用に耐える担体を研究し、実用的に使用する免疫アフィニティクロマトグラフィー用吸着体及びその製法を完成するに至った。すなわち、本発明はリガンドである抗体を過ヨウ素酸又はその塩を用いてpH1~5の条件下で酸化して糖鎖部分にアルデヒド基を形成させ、次にアミノ基又

はヒドラジド基を有する固定化用担体と接触させて、シッフ塩基を形成して結合させ、水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤でシッフ塩基を還元して安定化するものである。

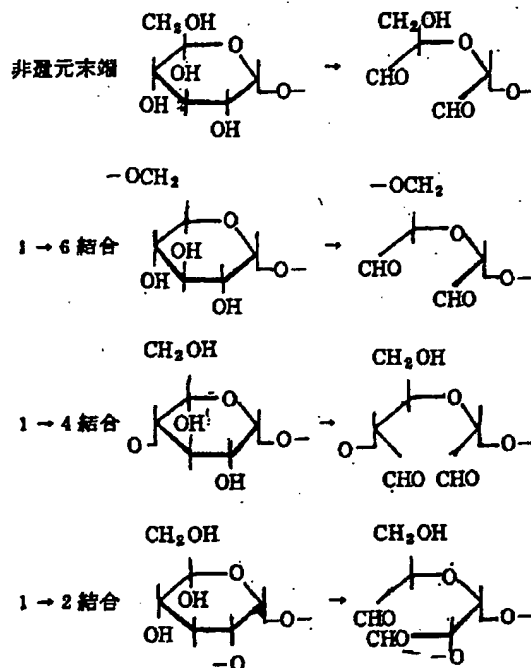
本発明によれば高い固定化収率と抗体活性を有し、しかも繰返し使用に耐える強度を併有する抗体吸着体が得られ、実用的、工業的規模でのアフィニティクロマトグラフィーが可能になった。

以下本発明を詳細に説明する。

本発明はリガンドである抗体を過ヨウ素酸又はその塩で酸化して糖鎖部分のグリコール部を分断してアルデヒド基を形成させ、次いでアミノ基又はヒドラジド基を有する固定化用担体と接触させてシッフ塩基反応で結合させ、水素化ホウ素ナトリウム等の還元剤でシッフ塩基を還元して安定化するものである。

過ヨウ素酸による酸化はグリコールの隣接ヒドロキシル基間で起り、1モルの IO_4^- が IO_3^- に還元されると同時に2モルのアルデヒド基が生成する反応である。この反応による生成物はグリコ

シド結合の種類によって異なるが、グリコール部が分断され、隣接ヒドロキシル基が酸化され、次式に示すような構造の生成物が得られる。



シッフ塩基の形成は反応PHに大きく依存し、

アミノ基含有化合物の塩基性度により、シッフ塩基形成が最大になるPHは異なるが、抗体の場合は中性付近での形成が大きい。(Immunoechemistry 15, 523(1978))このことは下記の実験例からも判断することができる。

実験例

0.1 Mの緩衝液10mLにヒトIgG(生化学工業特製)3mgを溶解し、 NaIO_4 1mgを添加して室温で30分間反応させた。緩衝液はPH2~4がClark and Lubaの緩衝液、PH4~6が酢酸緩衝液、PH6~8がリン酸緩衝液である。

次にエチレングリコールを最終濃度0.1 Mとなるよう添加し、温度4°Cで4時間反応させ、その反応液の光学密度(OD 660 nm)を測定して、第1図に示した。

第1図から判るように中性付近が濃度が大きく、IgG分子のアミノ基が関与した自己会合反応によるものと考えられる。これは酸化反応時にIgG分子の糖鎖中のアルデヒド基とポリペプチド中のアミノ基の間にシッフ塩基が形成され、IgG分子が

自己会合したものである。従って抗体の糖鎖の過ヨウ素酸又はその塩による酸化反応は、副反応である抗体分子間のシッフ塩基の形成の抑制されるPHで行うことが望ましい。特開昭52-104591の方法では、糖鎖の酸化反応をPH6付近で行っているが抗体の場合抗体分子の自己会合反応が生じ、抗体活性及び固定化収率が大幅に低下する欠点がある。本発明は、抗体の糖鎖の過ヨウ素酸又は、その塩による酸化反応を、酸化反応時の副反応である抗体分子間の自己会合反応を抑制するPHで行うことにより、固定化担体への抗体の結合効率を大幅に改善すると共に高い抗原回収率を有する担体を得ることができる。

糖鎖の酸化に使用する過ヨウ素酸あるいはその塩は、抗体の1~10万倍モル程度の範囲内で使用する。抗体の100倍モル以上使用すると、1時間以内の反応時間で十分である。過ヨウ素酸溶液は光により分解するので、反応は光を遮断して行った方がよいが、過剰量の過ヨウ素酸溶液を使用し数時間以内の反応ならば、特に光を遮断しなく

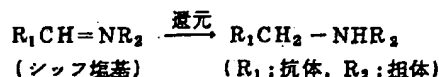
でも問題はない。

所定のPHを維持するためには、一般に緩衝液を使用するが、緩衝液としては、酸化反応により糖鎖に形成されたアルデヒド基と反応する官能基を含有するもの以外はすべて使用可能である。ただし、リン酸緩衝液は過ヨウ素酸と反応するのでその使用を避けた方がよい場合もある。緩衝液の濃度は0.001~1M、好ましくは0.01~0.5Mで使用することが好ましい。緩衝液のPHは、抗体の糖鎖を過ヨウ素酸又はその塩で酸化する場合、副反応を抑制するため、PH1~5であるが、抗体分子に酸変性が生じない範囲で低いことが望ましく、4.5以下、より好ましくは2~4である。PH1以下では抗体分子の酸変性が著しく、又PH5以上では副反応である抗体分子の自己会合反応が生じるので好ましくない。

抗体の糖鎖の酸化反応温度は、0~60°C、好ましくは5~20°Cである。60°C以上では抗体が失活し、0°C以下では反応しない。

酸化剤としては、過ヨウ素酸又はその塩の他に、

と担体をシッフ塩基反応で結合する。しかし形成されたシッフ塩基は、不安定であり、酸性又はアルカリ性条件下で容易に分解する。免疫アフィニティークロマトグラフィーにおいては、抗体結合担体を繰り返し使用し、吸着タンパク質の溶出も酸性条件で行うことが多い。従って抗体と担体間のシッフ塩基を安定化する必要がある。安定化は次式に示されるように、還元により行われる。



抗体と担体間のシッフ塩基の還元は、水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₄)又はシアノ水素化ホウ素ナトリウム(NaBH₃CN)により、0~25°C、PH5~10で、数十分から数十時間の反応で行われる。

還元剤としては、水素化ホウ素ナトリウム又は、シアノ水素化ホウ素ナトリウムの他に、ヨウ化ホウ素・硫化ホウ素・水素化アルミニウム、リチウム・亜硫酸塩・硫化ナトリウム・硫化アンモニウム等が挙げられるが、特に水素化ホウ素ナトリウム又は

次亜塩素酸又はその塩、過酸化ホウ素、過マンガン酸カリ、塩素、硝酸等があるが、特に過ヨウ素酸又はその塩が最も良好な結果が得られる。

酸化反応後残存する過剰の酸化剤は、糖鎖部分の過度の酸化及び酸化剤の担体への作用を避けるため除去する必要がある。エチレングリコール・グリセリン・グルコース・亜硫酸ナトリウム等、酸化剤により酸化され得る化学薬品を添加するか、又は酸化反応に使用したのと同じ緩衝液に対して透析するか、又はその他一般的な方法で除去することができる。

糖鎖にアルデヒド基を有する抗体を、少なくとも1つの反応性アミノ基又はヒドラジド基を有する担体に結合させる場合、反応のPHは5~8好ましくはPH6~7である。このPH範囲外では、主反応である抗体の糖鎖中のアルデヒド基と担体のアミノ基又はヒドラジド基間のシッフ塩基形成が抑制される。PH5~8好ましくはPH6~7の緩衝液中で、抗体と担体を共存させ、0~25°Cで数時間から数日間反応させることにより、抗体

シアノ水素化ホウ素ナトリウムが最も好ましいものである。

固定化用担体としては、少なくとも1つの反応性アミノ基又はヒドラジド基を有する多孔性セルロースビーズの誘導体の他に、アミノ化又はヒドラジド化ポリステレン・架橋性アミノ化又はヒドラジド化ポリアル・アミノ化又はヒドラジド化アガロース・アミノ化又はヒドラジド化デキストラン・アミノ化又はヒドラジド化ガラスビーズ等が挙げられる。

アフィニティークロマトグラフィーに用いる担体としては、一般に合成ポリマーは物理的強度の充分なものは疎水性に基づく非特異的吸着が起りやすく、ガラスビーズはリガンドの吸着効率が劣るが多孔性セルロースビーズは充分な物理的強度があり、しかも非特異的吸着がなく、表面積が大きく、吸着効率高く、かつ安価であり、本発明に最も適した担体の一つである。

少なくとも1つの反応性アミノ基又はヒドラジド基を有する多孔性セルロースビーズの誘導体は、

市販品例えばアミノヘキシルセルロース(AH-セルロース、メルク社製)、カルボメトキシセルロースヒドラジド(CM-セルロースヒドラジド、メルク社製)を使用してもよく、又多孔性セルロースビーズから誘導体を作製して使用してもよい。多孔性セルロースビーズから誘導体を作製する方法には、例えば多孔性セルロースビーズをエポキシ化し、さらにアンモニアでアミノ化する方法(有機合成化学、第38巻、第2号128頁('80))、又は臭化シアンで活性化し一般式 $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{NH}_2$ で示されるジアミン類を結合させてω-アミノアルキルアミン-セルロースを得る方法(千畑ら、「アフィニティークロマトグラフィー」講談社)又は臭化シアン活性化多孔性セルロースビーズに、一般式 $\text{NH}_2\text{NHCO}(\text{CH}_2)_n\text{CONHNH}_2$ で示されるジヒドラジド類を結合させて、ヒドラジド誘導体を得る方法などがある。本発明に係るビーズは粒径50~1000 μ 、孔径50~1000 \AA 程度のものが好適であるが、この範囲に制限されるものではない。これら担体は前記の条件を満足するものであれば

い。

なお、以下の実施例において抗原回収率は下記の方法によって測定した。

1) 抗原の放射性ヨウ素(^{125}I)標識

クロラミンT法(Nature, 194, 495('62))

により ^{125}I で標識し、ゲル濾過により精製した。

2) 可溶性抗体の抗原結合量の測定

一定量の抗原溶液(^{125}I 標識した抗原溶液の希釈系列溶液)を等量加えて良く攪拌し、一定時間放置後遠心分離し、上清又は沈降物の放射活性を測定し、結合し得る抗原量の最大値を求めた。(抗原濃度、抗体濃度及び放置時間は予備実験により決定した。)

3) 吸着体(固定化抗体)の抗原結合量の測定

吸着体をカラムに充填し、 ^{125}I で標識した抗原を供給してアフィニティークロマトグラフィーを行い、吸着された抗原の放射活性を測定して、吸着体の抗原結合量を求めた。

4) 抗原回収率の算出

実際のカラム反応において吸着された抗原量

よく、市販品を使用しても、また本発明の目的により適するように特別に調製したものであってもよい。(Biotechnol. Bioeng, 18, 1507('76))

本発明において用いる抗体は、公知の方法により免疫動物から得られる抗血清及び細胞融合法により得られる単クローン性抗体である。いずれの場合も硫酸塩析又は冷エタノール沈澱法等で精製して用いられるが、さらにDEAE-セルロース又はゲル濾過等のカラムクロマトグラフィーで精製して用いることが好ましい。

以上詳述したように本発明は抗体の特異的反応に直接関与していない糖鎖部分を酸化して $-\text{CH}_2-\text{NH}-$ 又は $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{NH}-\text{CO}-$ 構造を介して担体に結合させるものであり、結合させるにあたり反応条件を制御することにより、抗体の不活性化を防ぎ、結合効率を高め、しかも繰返し使用に耐える物理的強度と高い抗原回収率を維持しうるものである。

以下、実施例を挙げてさらに具体的に説明するが、本発明はこれによって制限されるものではない。

(X)と吸着体の作製に使用した可溶性抗体が結合し得る抗原量の最大値(Y)の比率で求めた。

すなわち、抗原回収率 $= \frac{X}{Y} \times 100(\%)$ とした。

実施例1-1

アミノ化多孔性セルロースビーズの調製法

多孔性セルロースビーズ(生化学工業精製、セルロファイン700m)1g(固形分)に蒸留水8mL、2N NaOH 21mL、エピクロルヒビリン6mLを順次加え、40°Cで3時間反応させ、550 $\mu\text{mole/g}$ (固形分)のエポキシ基を有するエポキシ化多孔性セルロースビーズを得た。さらにこのエポキシ化多孔性セルロースビーズを濃アンモニア水と40°Cで2時間反応させ、500 $\mu\text{mole/g}$ (固形分)のアミノ基を有するアミノ化多孔性セルロースビーズを得た。

なおエポキシ基の定量は、塩酸による滴定法(J. Chromatogr. 90, 87('74))により、アミノ基の定量はInmanとDintzisの方法(Biochemistry 8, 4074('68))によった。

実施例1-2

抗ウシアルブミン抗体へのアルデヒド基の導入
精製抗ウシアルブミン抗体を、ウサギの抗血清
(富士臓器特製)より硫酸塩析により調製した。
この精製抗ウシアルブミン抗体15mgを、10mL
の0.1M酢酸緩衝液(PH 3.7)に溶解し、NaIO₄
1mgを添加して、室温で30分間反応させた。次
にエチレングリコールを最終濃度が0.1Mとなる
よう添加し、4°Cで4時間反応した。さらにこの
反応液を4°Cで18時間0.1M酢酸緩衝液(PH
3.7)1Lに対し透析した。

実施例1-3

アルデヒド基導入抗ウシアルブミン抗体のアミ
ノ化多孔性セルロースビーズへの結合

実施例1-2で調製したアルデヒド基導入抗ウ
シアルブミン抗体に、実施例1-1で調製したア
ミノ化多孔性セルロースビーズ0.4g(固形分)
を添加し、0.1M炭酸ナトリウム緩衝液(PH9)
によりPHを6に調整した。4°Cで一晩反応させ
た後、形成したシッフ塩基にNaBH₄5mgを加え、

蒸留水200mL、さらに冷却した0.25MNaHCO₃
100mLを用いて洗浄して、CNBr活性化アガロ
ースを得た。

こうして得られたCNBr活性化アガロース0.4g
(固形分)を実施例1で調製した精製抗ウシアル
ブミン抗体15mgを含有する0.25M炭酸ナトリウ
ム緩衝液(0.5MNaCl含有、PH8.5)20mL中
に懸濁させ、4°Cで一晩反応させた。反応後残存
する活性基は0.2Mグリシン(PH8.5)で室温
で2時間処理して除いた。

こうして得られた抗ウシアルブミン抗体結合ア
ガロースのウシアルブミン吸着量は、1g(固形
分)あたり3mgであり、抗原回収率は17%であ
った。

実施例2-1

実施例1及び比較例1で調製した免疫アフィニ
ティークロマトグラフィー用親和性吸着体による
ウシ血清中のアルブミンの精製実験例

実施例1で調製した抗ウシアルブミン抗体結合
多孔性セルロースビーズ0.4g(固形分)及び比

4°C、5時間PH8.5の条件で処理して還元し安
定化した。こうして得られた抗ウシアルブミン抗
体結合多孔性セルロースビーズのウシアルブミン
吸着量は、1g(固形分)あたり15mgであり、
抗原回収率は9.0%であった。

なお比較のため、NaIO₄で処理しない精製抗ウ
シアルブミン抗体を、上記と全く同様の方法でア
ミノ化多孔性セルロースビーズと接触させたが、
抗体の結合は全くみられなかった。

比較例1 CNBr活性化アガロースへの抗ウシアル
ブミン抗体の結合

市販のセファロース4B(ファルマジエ社製)
8mLをガラスフィルター上に移し、蒸留水200mL
で洗浄、吸引後、蒸留水20mLに懸濁させた。攪
拌下、1.0NNaOHでPHを11~12とし、これ
にCNBr水溶液(25gCNBr/50mL蒸留水)
を徐々添加した。この間PHは1.0NNaOHを添
加することにより11~12に維持した。反応液
の温度は30°Cを超えないように操作した。反応
終了後、ガラスフィルターで濾過した。次いで冷

較例1で調製した抗ウシアルブミン抗体結合アガ
ロース0.6g(固形分)をカラム(1cmφ×25cm)
に充填し、ウシ血清0.15mLをカラム上部より供
給し、0.02Mホウ酸緩衝液(PH8、0.15MNaCl
含有)を流下させた。カラムよりの流出液のOD
280nmが0.03以下になるまで上記と同じ緩衝液
を通液後、2MKSCN溶液を通液して吸着されて
いたウシアルブミンを溶出した。その結果を表及
び第2図に示す。

なお、蛋白量はLowryの方法にしたがい測定し
た。(Lowry, O. H., Rowebrough, N. J., Fall,
A. L. and Randall, R. J. Journal of Biological
Chemistry 193 265 (1951)),第4図について
も同様である。

表

	免疫アフィニティークロ マトグラフィー用吸着体	ウシアルブミン回収率
実施例1	抗ウシアルブミン抗体結合 多孔性セルロースビーズ	100%
比較例1	抗ウシアルブミン抗体結 合アガロース	33%

又、比較例1では流速が $10\text{ mL}/\text{cm} \cdot \text{h}$ を越すと精製が不可能であるのに反し、実施例1では流速が $25\text{ mL}/\text{cm} \cdot \text{h}$ でも良好な結果が得られた。

なお、 0.2 M グリシン-塩酸緩衝液による溶出画分がウシアルブミンであることは、オクタロニ-法〔新実験化学講座20-(I)-生物化学、丸善〕により確認し、この溶出画分をSDSポリアクリルアミド電気泳動で分析したところ、アルブミンのバンドのみを示した。

実施例2-2

実施例2-1で行ったと同じカラム操作を繰り返して行ったところ比較例1の方法で調製した抗ウシアルブミン抗体結合アガロースは5回使用後、ウシアルブミン吸着容量の顕著な低下を示したが、実施例1の方法で調製した抗ウシアルブミン抗体結合多孔性セルロースビーズは15回使用後も、全くウシアルブミン吸着容量の低下はみられなかった。この結果を第3図に示す。

比較例2

抗体の酸化反応を $\text{PH}5$ 以上で行った場合

ルロファイン700m) 1 g を実施例1-1の方法でエポキシ化し、 $550\text{ }\mu\text{ mole}/\text{g}$ (固形分)のエポキシ基を有するエポキシ化多孔性セルロースビーズを得た。これをアジピン酸ジヒドラジドの飽和溶液(約 $90\text{ g}/1\text{ L}$ ・ 0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液($\text{PH}9$)) 10 mL に懸濁させ、 4°C で一晩反応させた。反応後 0.2 M NaCl で、洗液が2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸(TNBS)反応に対し陰性になるまで洗浄した。

こうして得られたヒドラジド化多孔性セルロースビーズは、 $150\text{ }\mu\text{ mole}/\text{g}$ (固形分)のヒドラジド基を有した。ヒドラジド基の定量はTNBS法で行った(Mol. Cell. Biochem., 4, 181('74))。

実施例3-2

抗ヒトクロキナーゼ抗体へのアルデヒド基の導入

精製抗ヒトクロキナーゼ抗体を、ウサギの抗血清(ミドリ十字特製)より硫酸塩析により調製した。この精製抗ヒトクロキナーゼ抗体 10 mg を、 10 mL の 0.1 M 酢酸緩衝液($\text{PH}3.7$)に溶解し、

実施例1-2において、精製抗ウシアルブミン抗体の NaIO_4 による酸化を 0.1 M リン酸緩衝液($\text{PH}6$)中で行った。すなわち、 10 mL の 0.1 M リン酸緩衝液($\text{PH}6$)に抗体を 15 mg 溶解し、 NaIO_4 1 mg を添加して室温で30分反応させた。この時点で反応液が濁り、抗体の自己会合が明らかに認められた。次にエチレングリコールを最終濃度が 0.1 M となるよう添加し、 4°C で4時間反応させた。 0.1 M リン酸緩衝液($\text{PH}6$) 1 L に対し 4°C で18時間透析後実施例1-1の方法で調製したアミノ化多孔性セルロースビーズを 0.4 g (固形分)添加し、 4°C で一晩反応させ、さらに NaBH_4 5 mg による還元処理を 4°C で5時間、 $\text{PH}8.5$ の条件で行った。こうして得られた抗ウシアルブミン抗体結合多孔性セルロースビーズのウシアルブミン吸着量は、 1 g (固形分)あたり 1 mg であり、抗原回収率は6%であった。

実施例3-1

ヒドラジド化多孔性セルロースビーズの調製法
多孔性セルロースビーズ(生化学工業特製、セ

NaIO_4 1 mg を添加して、室温で30分間反応させた。次にエチレングリコールを最終濃度が 0.05 M となるよう添加し、 4°C で3時間反応させた。さらにこの反応液を 4°C で18時間、 0.1 M 酢酸緩衝液($\text{PH}3.7$) 1 L に対し透析した。

実施例3-3

アルデヒド基導入抗ヒトクロキナーゼ抗体のヒドラジド化多孔性セルロースビーズへの結合

実施例3-2で調製したアルデヒド基導入抗ヒトクロキナーゼ抗体に、実施例3-1で調製したヒドラジド化多孔性セルロースビーズ 0.5 g (固形分)を添加し、 0.1 M 炭酸ナトリウム緩衝液($\text{PH}9$)により PH を6に調整した。 4°C で一晩反応後、 NaBH_4 5 mg を用いて 4°C 、5時間、 $\text{PH}8.5$ の条件で処理して、シッフ塩基を安定化させ、免疫アフィニティークロマトグラフィー用吸着体を得た。

実施例4

実施例3で調製した免疫アフィニティークロマトグラフィー用吸着体による人尿中のクロキナー

ゼの精製

実施例3で調製した抗ヒトウロキナーゼ抗体結合多孔性セルロースビーズ0.4g(固形分)をカラム(1cm ϕ ×2.5cm)に充填し、人尿より得たウロキナーゼ原末(700国際単位/mg)0.2gをカラム上部より供給し、0.1Mリン酸緩衝生理食塩水(PH 7.5)を流下させた。溶出液のOD_{280nm}が0.03以下になるまで上記と同じ緩衝液を通液後、1.5M KSCNで吸着されていたウロキナーゼを溶出させた。この結果を第4図に示す。

KSCNによる溶出液を透析してKSCNを除去し、低温で濃縮してさらに凍結乾燥したところ、13万国単位/mgタンパクの比活性をもつウロキナーゼが得られ、活性回収率は92%であった。また発熱性物質の試験結果は陰性であった。

なお本カラム操作を繰り返し10回行ったが、ヒトウロキナーゼの吸着容量の低下は全くみられなかった。

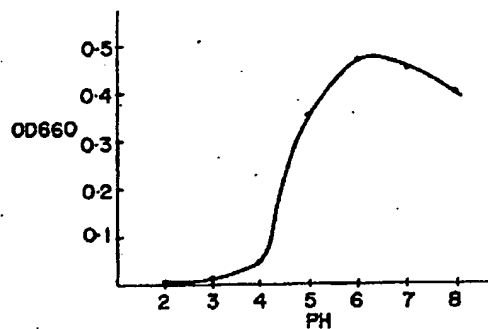
ウロキナーゼ活性の測定は、フィブリン平板法(P. L. Walton, Clin. Chim. Acta, 13, 680

(1966))で、発熱性物質の試験は日本薬局方一般試験法第27項発熱性試験法に準じ、投与量は60000国際単位/kgで行った。

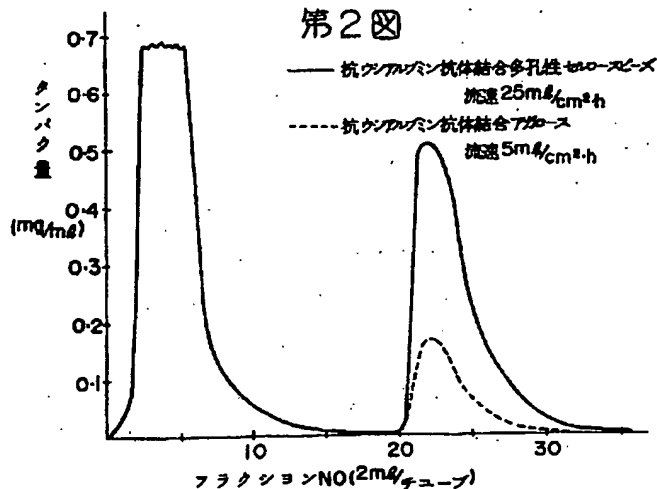
4. 図面の簡単な説明

第1図は抗体をNaIO₄で酸化する際のPHと反応液の光学密度との関係を示すグラフ、第2図及び第4図はそれぞれウシアルブミン及びウロキナーゼのアフィニティーカラムによる精製結果を示すグラフ、第3図はカラム操作における吸着量と繰返し回数との関係を示すグラフである。

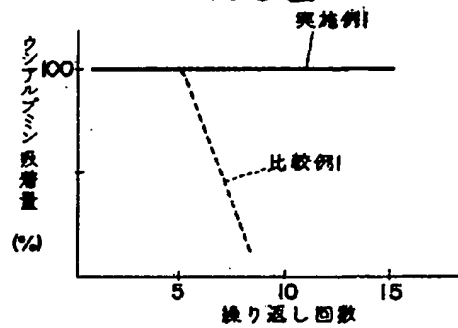
第1図



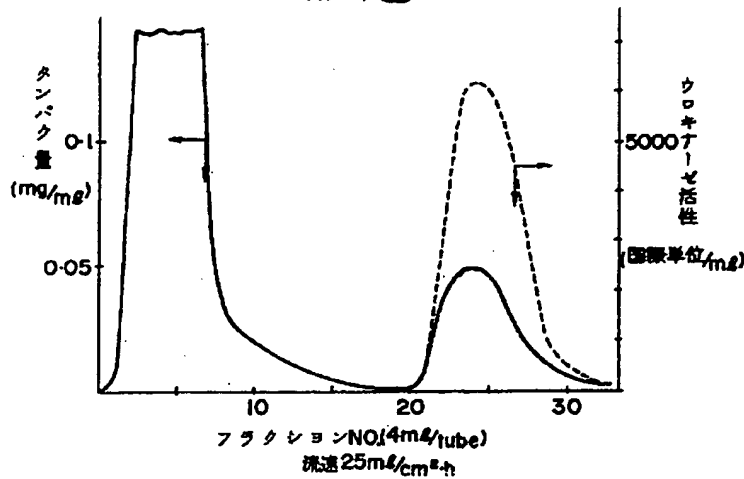
第2図



第3図



第4図



手続補正書

昭和56年10月31日

特許庁長官 島田 春樹 殿

1. 事件の表示

昭和56年特許願第151462号

2. 発明の名称

免疫アフィニティクロマトグラフィー用吸着体及びその製法

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 〒100 東京都千代田区有楽町1丁目4番1号

名称 (329) 電気化学工業株式会社

代表者 篠原 晃



4. 補正命令の日付

自 発

5. 補正の対象

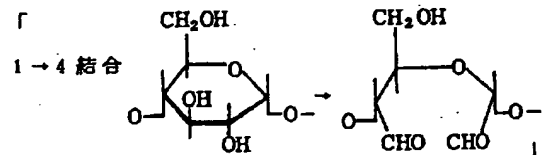
明細書の発明の詳細な説明の欄

6. 補正の内容

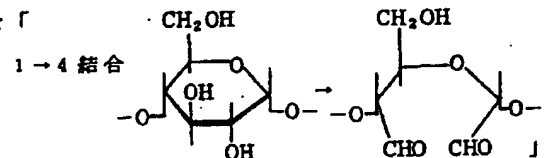
(1) 明細書、3頁、下から2行「…方法においても、」を「…方法においては、」に訂正する。

(2) 同、8頁、4～5行の「高価な単クローン性抗体を固定するにあたり、」を「抗体を固定化することにあたり、」に訂正する。

(3) 同、8頁、6行の



を「



に訂正する。

(4) 同、17頁、8行の「抗原溶液」を「抗体溶液」に訂正する。

(5) 同、18頁、9行の「エピクロルヒビリン」を「エピクロルヒドリン」に訂正する。

- (6) 同、23頁、4行の「0.2 Mグリシン-塩酸緩衝液」を「2 M KSCN溶液」に訂正する。

以 上